

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-261068

(P2004-261068A)

(43) 公開日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/78 C	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 M	4 B 0 6 3
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-54283 (P2003-54283)

(22) 出願日 平成15年2月28日 (2003. 2. 28)

特許法第30条第1項適用申請有り 2002年9月5日  
 日 社団法人日本分析化学会発行の「日本分析化学会  
 第61年会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 503081759

寺前 紀夫

宮城県仙台市青葉区川内元支倉35 川内  
住宅1-501

(71) 出願人 395023060

株式会社東京インスツルメンツ

東京都江戸川区西葛西6丁目18番14号

(74) 代理人 100067736

弁理士 小池 晃

(74) 代理人 100086335

弁理士 田村 榮一

(74) 代理人 100096677

弁理士 伊賀 誠司

最終頁に続く

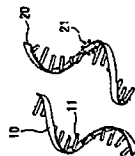
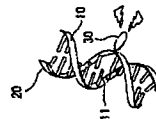
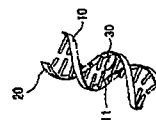
(54) 【発明の名称】 一塩基置換検出方法及び一塩基置換検出用キット

## (57) 【要約】

【課題】 工程数を極力減らし、簡便且つ迅速に遺伝子の一塩基置換を検出する。

【解決手段】 SNPに関連する標的塩基11を含む一本鎖の標的核酸10とハイブリダイゼーションさせる一本鎖の検出用核酸20のうち、標的塩基11に対応する位置の塩基を予め除き、脱塩基部位21としておく。そして、これらの標的核酸10及び検出用核酸20をハイブリダイゼーションさせることで標的塩基11の周辺に意図的に疎水場空間を構築した後、この疎水場空間に水素結合型のレセプター分子30を挿入する。その後、標的塩基の違いに基づくレセプター分子の蛍光強度変化を検出し、一塩基置換を検出する。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

一塩基置換部位を有する一本鎖の標的核酸と相補的であり、且つ該一塩基置換部位に対応する対応塩基が除かれた一本鎖の検出用核酸を調製する工程と、  
上記標的核酸と上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成する工程と、  
上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプターを添加し、上記一塩基置換部位と水素結合を形成させる工程と、  
上記レセプターの蛍光強度を測定する工程と  
を有することを特徴とする一塩基置換検出方法。

## 【請求項2】

10

上記レセプターは、複素環式芳香族基を有し、上記一塩基置換部位との水素結合形成及び上記対応塩基の周囲の塩基とのスタッキング相互作用により安定化されることで、上記一塩基置換部位と対を形成することを特徴とする請求項1記載の一塩基置換検出方法。

## 【請求項3】

上記レセプターは、ナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、プテリジン誘導体、クマリン誘導体及びインダゾール誘導体からなる群の少なくとも1つであることを特徴とする請求項2記載の一塩基置換検出方法。

## 【請求項4】

上記レセプターは、2-アミノ-7-メチルナフチリジン又は2-アミノ-4-オキソプテリジンであることを特徴とする請求項3記載の一塩基置換検出方法。

20

## 【請求項5】

一塩基置換部位を有する一本鎖の標的核酸と、該標的核酸と相補的であり、且つ上記一塩基置換部位に対応する対応塩基が除かれた一本鎖の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させ、上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプターを添加して上記一塩基置換部位と水素結合を形成させ、上記レセプターの蛍光強度を測定するための一塩基置換検出用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、バイオインフォマティクス（生命情報科学）分野において特に有用な一塩基置換検出方法及びその方法を用いた一塩基置換検出用キットに関し、特に遺伝子配列における一塩基置換（point mutation）を簡便且つ迅速に検出する一塩基置換検出方法及び一塩基置換検出用キットに関する。

30

## 【0002】

## 【従来の技術】

ヒトゲノム配列が解読された今日の研究目標の1つは、遺伝子の同定、機能の解析、さらに遺伝子発現や機能に影響して個体差を決める遺伝子の多様性である。ここで、核酸塩基配列中の一塩基の違いから生じる遺伝子の個体差のことを一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism; SNP）と呼び、遺伝子中に点在するSNPが各種疾患と強く関連することが明らかとなっている。

40

## 【0003】

現在、この一塩基置換を検出する方法としては、制限酵素で切断したDNA断片をゲルにより分離した後、色素でDNA断片を染色・検出するという電気泳動法が挙げられる。この方法は汎用されているものの、分離や染色に必要な時間が長く、迅速性に欠けるという欠点がある。

## 【0004】

また、マイクロアレイ技術によって所定のDNAが微細配列された、いわゆるDNAチップと呼ばれるバイオアッセイ用の集積基板も、一塩基置換の検出に利用され始めている。このDNAチップは、ガラス基板やシリコン基板上に多種多数のDNAオリゴヌクレオチド鎖やcDNA等が集積されていることから、一度に多数の遺伝子検査が可能であり、臨

50

床検査現場等への適用が期待されている。しかしながら、核酸塩基のミスマッチ形成に由来するDNA二本鎖の安定性を原理とする手法であるため、塩基配列によってはその温度制御が困難であり、さらに放射性物質や蛍光色素を被検体自体に修飾する前処理が必要である等の問題がある。

#### 【0005】

さらに、被検体の増幅と検出を同時に行うリアルタイムPCR法が、核酸増幅法による一段階の迅速な定量測定 of 技術として、近年普及しつつある。しかしながら、増幅反応における複雑な温度制御、プローブの導入も含めた各遺伝子配列に適用するプライマーの設計が複雑である上に、増幅装置や条件によって結果が異なる場合も少なくなく、再現性の面においても課題を残している。

10

#### 【0006】

このように、従来の遺伝子変異を検出する技術は、精密な温度制御、煩雑な被検体の前処理、測定までの時間が長い等の問題があり、簡便且つ迅速に遺伝子検査を行うことが不可能であった。

#### 【0007】

一方、下記非特許文献1には、ミスマッチ塩基対に結合する分子リガンドを固定化した表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance; SPR) センサーを利用した新規な一塩基置換検出方法が提案されている。この文献記載の方法によれば、SNPを持つ2種類のDNAからミスマッチ塩基対を含むヘテロDNAを作成し、このDNA溶液をナフチリジン二量体が固定化されたSPRセンサーチップ上に流してSPR信号強度を検出することにより、一塩基置換を迅速に検出することができる。

20

#### 【0008】

##### 【非特許文献1】

中谷和彦, 山東信介, 齋藤烈 著, 「表面プラズモン共鳴を利用した合成リガンドによるDNA中グアニン-グアニンミスマッチの検出法 (Scanning of guanine-guanine mismatches in DNA by synthetic ligands using surface plasmon resonance)」, ネイチャーバイオテクノロジー (Nature Biotechnology), 2001年1月, 第19号, p. 51-55

#### 【0009】

30

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、この非特許文献1に記載の技術では、一塩基置換を検出するために予めミスマッチ塩基対を含むヘテロDNAを作成する必要があるため、SPRセンサーを用いる必要もあるため、より簡便且つ迅速に遺伝子検査を行う方法が望まれている。

#### 【0010】

本発明は、このような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、工程数を極力減らし、簡便且つ迅速に遺伝子の一塩基置換を検出する一塩基置換検出方法及び一塩基置換検出用キットを提供することを目的とする。

#### 【0011】

##### 【課題を解決するための手段】

40

上述した目的を達成するために、本発明に係る一塩基置換検出方法は、一塩基置換部位を有する一本鎖の標的核酸と相補的であり、且つ該一塩基置換部位に対応する対応塩基が除かれた一本鎖の検出用核酸を調製する工程と、上記標的核酸と上記検出用核酸とで二本鎖核酸を形成する工程と、上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプターを添加し、上記一塩基置換部位と水素結合を形成させる工程と、上記レセプターの蛍光強度を測定する工程とを有する。

#### 【0012】

ここで、上記レセプターは、複素環式芳香族基を有し、上記一塩基置換部位との水素結合形成及び上記対応塩基の周囲の塩基とのスタッキング相互作用により安定化されることで、上記一塩基置換部位と対を形成するものが望ましい。具体的には、ナフチリジン誘導体 50

、キノリン誘導体、プテリジン誘導体、クマリン誘導体及びインダゾール誘導体からなる群の少なくとも1つであり、例えば2-アミノ-7-メチルナフチリジン又は2-アミノ-4-オキソプテリジンである。

【0013】

また、本発明に係る一塩基置換検出用キットは、一塩基置換部位を有する一本鎖の標的核酸と、該標的核酸と相補的であり、且つ上記一塩基置換部位に対応する対応塩基が除かれた一本鎖の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させ、上記二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプターを添加して上記一塩基置換部位と水素結合を形成させ、上記レセプターの蛍光強度を測定するためのものである。

【0014】

10

【発明の実施の形態】

一般に、水素結合を利用する核酸塩基認識では、レセプター分子の水素結合様式や数を変化させることで、比較的容易に高い塩基選択性を獲得できる特徴を持つ。この際、完全水溶液中では水素結合形成に基づく認識機能の発現は期待できないため、従来の研究の多くは、クロロホルム中のような無極性溶媒環境下に限定されていたが、溶媒中の核酸が変性、沈殿する要因ともなっていた。

【0015】

そこで、本実施の形態では、図1に概念的に示すように、SNPに関連する標的塩基11を含む一本鎖の標的核酸10とハイブリダイゼーションさせる一本鎖の検出用核酸20のうち、標的塩基11に対応する位置の塩基を予め除き、脱塩基部位21としておく。そして、これらの標的核酸10及び検出用核酸20をハイブリダイゼーションさせることで標的塩基11の周辺に意図的に疎水場空間を構築した後、この疎水場空間に水素結合型のレセプター分子30を挿入する。

20

【0016】

このように、核酸塩基を除いて構築された疎水場空間内に水素結合性のレセプター分子30を挿入し、標的塩基11と水素結合を形成させることで、完全水溶液中においても効果的に核酸塩基認識を行い、標的塩基11の変異を検出することができる。

【0017】

ここで、本実施の形態で分析可能な標的核酸10としては、例えばヒトや植物由来のDNA、cDNA等が挙げられるが、特に限定されず、必要に応じて希釈、濃縮、増幅を行う。

30

【0018】

また、水素結合性を有するレセプター分子30としては、水素結合部位を有し、発蛍光性であるような試薬が望ましい。具体的には、水素結合部位を少なくとも一段、好ましくは複数段有し、脱塩基部位に隣接する核酸塩基とスタッキングできるような複素環式芳香族基を有する試薬が望ましい。特に水溶性を有する試薬が好ましいが、非水溶性の場合には有機溶媒を微量用いることにより、対応が可能である。このようなレセプター分子としては、例えばナフチリジン誘導体、キノリン誘導体、プテリジン誘導体、クマリン誘導体、インダゾール誘導体等が挙げられる。

【0019】

40

以下、本発明を適用した具体的な実施例について図面を参照しながら詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能であることは勿論である。

【0020】

【実施例】

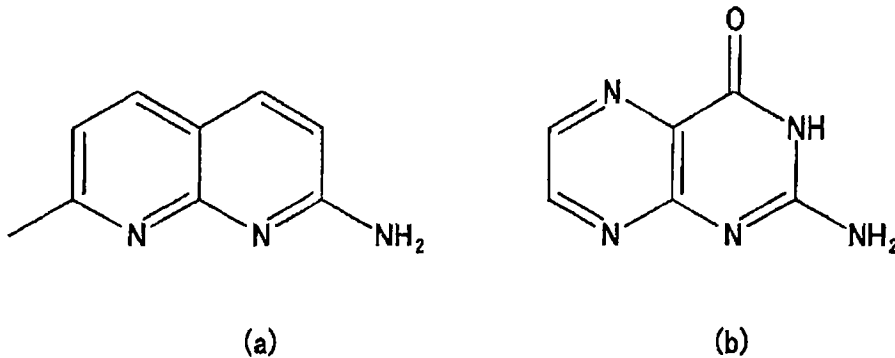
以下の実施例では、レセプター分子として、以下の化学式に示すようなナフチリジン誘導体である(a)2-アミノ-7-メチルナフチリジン(AMND)と、プテリジン誘導体である(b)2-アミノ-4-オキソプテリジン(プテリン)とを準備した。このうち、プテリンは和光純薬株式会社から購入し(Cat. No. 539-32611)、AMNDは、文献「E. V. Brown, J. Org. Chem., Vol. 30,

50

p 1 6 0 7, 1 9 6 5」を参考にして、1, 1-ジメトキシブタノンから合成した。

【0021】

【化1】



10

【0022】

この2つのレセプター分子は発蛍光性を有し、後述するように、検出用DNAの脱塩基部位に挿入されたときに標的塩基と相互作用し、標的塩基の違いに基づき蛍光強度が変化するため、蛍光強度を測定することで一塩基置換を検出することができる。

20

【0023】

ここで、DNAとレセプター分子とを混合する際、レセプター分子は、該レセプター分子を含有する溶液の形態で混合してもよく、粉末や固形状の形態で混合してもよい。また、蛍光測定は、UVランプを用いて目視で行ってもよく、蛍光分光器、蛍光顕微鏡、デンストメーター等の機器を用いてもよい。

【0024】

また、レセプター分子による一塩基置換検出の効果を検証するために、以下のような検出用DNA（配列A）と標的DNA（配列B）とをモデル配列として、株式会社日本遺伝子研究所に受注して合成した。

（配列A）5'-TCCAGXGCAAC-3'（配列番号1）

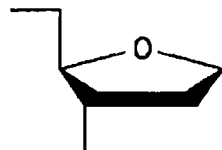
30

（配列B）3'-AGGTCNCGT TG-5'（配列番号2～5）

ここで、上記配列中、Xは脱塩基部位（A P s i t e）であり、具体的には以下の化学式に示すようなテトラヒドロフラニル残基（d S p a c e r）を示す。また、NはG（配列番号2）、C（配列番号3）、A（配列番号4）、T（配列番号5）の何れかを示す。

【0025】

【化2】



40

【0026】

#### 実施例 1

#### DNA融解温度（Tm）の測定

実施例1では、二本鎖が一本鎖に解離する融解温度（m e l t i n g t e m p r a t u 50

re ;  $T_m$ ) を測定し、レセプター分子の添加前後における  $T_m$  値の変化から、DNA との相互作用を検討した。具体的には、脱塩基部位を含む一本鎖の検出用 DNA (上記配列 A) と被検体となる一本鎖の標的 DNA 溶液 (上記配列 B) とがアニーリングした二本鎖 DNA 溶液が  $30 \mu\text{M}$ 、イオン強度調節剤として NaCl が  $100 \text{mM}$ 、緩衝剤として  $1 \text{mM}$  EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を含むカコジル酸ナトリウム ( $\text{pH} 7.0$ ) が  $10 \text{mM}$ 、レセプター分子として AMND 又は プテリン がそれぞれ  $580 \mu\text{M}$ 、 $290 \mu\text{M}$  となるように Milli Q 水を加えて調製した DNA 溶液を毎秒  $1.5^\circ\text{C}$  の割合で加熱して  $T_m$  値を測定した。

#### 【0027】

ここで、一本鎖 DNA の濃度は、文献「Puglisi J. D. et al., Methods in enzymology, Vol. 180, p304-p325, 1989」を参考にして、モル吸光係数算出法を用いて吸光度で調整した。この際、脱塩基部位を含む一本鎖 DNA (上記配列 A) のモル吸光係数は、TCGGA の吸光係数と GCAAC の吸光係数との和とした。また、アニーリングは、サーマルサイクラーを用いて  $75^\circ\text{C}$  で  $10$  分間加熱した後、毎秒  $3^\circ\text{C}$  の割合で  $5^\circ\text{C}$  まで冷却し、毎秒  $1^\circ\text{C}$  の割合で  $20^\circ\text{C}$  まで再度加熱することにより行った。

#### 【0028】

脱塩基部位 X に対応する標的塩基 N が G, C, A, T である場合のそれぞれについて、レセプター分子の添加前の  $T_m$  値 ( $T_{m(-)}$ )、添加後の  $T_m$  値 ( $T_{m(+)}$ ) 及びその変化量 ( $\Delta T_m$ ) の測定結果を以下の表 1 に示す。

#### 【0029】

【表 1】

	-	AMND	プテリン
N	$T_{m(-)} [^\circ\text{C}]$	$T_{m(+)} (\Delta T_m) [^\circ\text{C}]$	$T_{m(+)} (\Delta T_m) [^\circ\text{C}]$
G	34.9	39.8(+4.9)	37.8(+2.9)
C	31.3	45.0(+13.7)	32.1(+0.8)
A	34.8	37.8(+3.0)	34.4(-0.4)
T	30.2	41.4(+11.2)	30.4(+0.2)

#### 【0030】

表 1 に示すように、AMND を添加した場合には、標的塩基 N が  $A < G < T < C$  の順で  $T_m$  値が上昇しており、AMND のピリミジン塩基選択性が確認できる。一方、プテリンを添加した場合には、標的塩基 N が G である場合に  $T_m$  値が有意に上昇しており、プテリンのグアニン選択性が確認できる。

#### 【0031】

また、 $N = C$  である二本鎖 DNA を  $30 \mu\text{M}$  含む DNA 溶液に AMND を添加した場合の  $T_m$  値の AMND 濃度依存性について検討した。結果を図 2 に示す。図 2 に示すように、AMND 添加による  $T_m$  値の上昇は比較的低濃度から生じ、 $500 \mu\text{M}$  の濃度以上でほぼ完全に上昇が飽和に達している。

#### 【0032】

#### 実施例 2

##### CD スペクトルの測定

実施例 2 では、二本鎖の CD スペクトルを測定し、レセプター分子の添加前後における CD スペクトルの変化から、DNA との相互作用を検討した。具体的には、脱塩基部位を含

一本鎖DNA（上記配列A）と被検体となる一本鎖DNA溶液（上記配列B）とがアニーリングした二本鎖DNA溶液が $30\mu\text{M}$ 、 $\text{NaCl}$ が $100\text{mM}$ 、 $\text{EDTA}$ が $1\text{mM}$ 、カコジル酸ナトリウム（ $\text{pH}7.0$ ）が $10\text{mM}$ 、レセプター分子としてAMNDが $72.5\mu\text{M}$ となるようにMilliQ水を加えて調製したDNA溶液について、CDスペクトルを測定した。

#### 【0033】

脱塩基部位Xに対応する標的塩基NがA, C, G, Tである場合のそれぞれについて、AMNDの添加前（破線）及び添加後（実線）のCDスペクトルの結果を図3（a）～（d）に示す。図3に示すように、標的塩基NがC, Tのときに選択的にCDスペクトルが変化していることが確認される。これは実施例1におけるAMNDのピリミジン塩基選択性 10の結果を支持するものであった。

#### 【0034】

また、 $N=C$ である二本鎖DNAを $30\mu\text{M}$ 含むDNA溶液にAMNDを添加した場合のCDスペクトルのAMND濃度依存性について検討した。結果を図4に示す。なお、図4には、二本鎖DNA溶液に $72.5\mu\text{M}$ のAMNDを添加する前（破線）と添加した後（実線）の吸光度と、 $580\mu\text{M}$ のAMNDの吸光度とを併せて示している。図4に示すように、AMND濃度の上昇に応じて、特に $245\text{nm}$ 付近及び $280\text{nm}$ 付近でモル橢円率 $\theta$ が上昇しており、 $30\mu\text{M}$ の濃度以上ではほぼ完全に上昇が飽和に達している。

#### 【0035】

波長が $278.5\text{nm}$ のときのAMND濃度とモル橢円率 $\theta$ との関係を図5に示す。図5 20に示すように、AMND添加によるモル橢円率 $\theta$ の上昇は $30\mu\text{M}$ の濃度以上ではほぼ完全に飽和に達している。この結果、AMNDの標的塩基Nへの結合定数 $K_{11}$ は $10^6\text{M}^{-1}$ 以上と求められ、AMNDが脱塩基部位Xに安定に取り込まれていることが分かる。

#### 【0036】

### 実施例3

#### 立体構造の検討

実施例3では、標的塩基NがC, T, A, Gである場合のそれぞれについて、AMND添加後のAmber力場（Macro Model）による最安定化構造を検討した。シミュレーション結果を図6（a）～（d）に示す。図6に示すように、標的塩基NがCの場合にはAMND分子が隣接するグアニン残基と重なっているのに対し、それ以外の場合には隣接するグアニン残基からずれていることが確認できる。この結果から、AMNDの塩基選択性が標的塩基Nとの水素結合形成、及び隣接する核酸塩基とのスタッキング相互作用に由来するものであることが推察される。 30

#### 【0037】

### 実施例4

#### 蛍光スペクトルの測定

実施例4では、レセプター分子添加後の蛍光強度の減少値（ $-\Delta F. I.$ ）を測定した。具体的には、脱塩基部位を含む一本鎖DNA（上記配列A）と被検体となる一本鎖DNA溶液（上記配列B）とがアニーリングした二本鎖DNA溶液が $60\mu\text{M}$ 、 $\text{NaCl}$ が $100\text{mM}$ 、 $\text{EDTA}$ が $1\text{mM}$ 、カコジル酸ナトリウム（ $\text{pH}7.0$ ）が $10\text{mM}$ 、レセプター分子としてAMND又はプテリンがそれぞれ $60\mu\text{M}$ 、 $15\mu\text{M}$ となるようにMilliQ水を加えて調製したDNA溶液について、蛍光強度を測定した。蛍光測定は、光路長 $1\text{mm}$ の蛍光測定用セルを用い、反射蛍光測定により行った。 40

#### 【0038】

脱塩基部位Xに対応する標的塩基NがG, C, A, Tである場合のそれぞれについて、AMND、プテリンの添加後における蛍光強度の減少値をそれぞれ図7、図8に示す。ここで、図7は励起波長 $355\text{nm}$ 、蛍光波長 $402\text{nm}$ であり、図8は励起波長 $360\text{nm}$ 、蛍光波長 $445\text{nm}$ である。図7、8に示すように、AMNDを添加した場合には、標的塩基NがC, Tといったピリミジン塩基のときに選択的に消光しており、プテリンを添加した場合には、標的塩基NがGのときに選択的に消光している。 50

【0039】

実施例 5実際の配列での検討 1

実施例 5 では、実際の p 5 3 関連遺伝子の 1 7 7 番アミノ酸における一塩基置換を検出する効果を検証するために、以下のような配列を株式会社日本遺伝子研究所に受注して合成した。ここで、下記配列中、X は脱塩基部位 (A P s i t e) であり、S は G (グアニン) 又は C (シトシン) を示す。

(配列 C) 5' - C T G C C S C C A C C - 3' (配列番号 6, 7)

(配列 D) 3' - G A C G G X G G T G G - 5' (配列番号 8)

上記配列 C において、脱塩基部位 X に対応する標的塩基 S は、正常型では C (配列番号 6 10) であり、変異型では G (配列番号 7) である。これにより、1 7 7 番アミノ酸はプロリンからアルギニンに変異する。本実施例では、この C から G への変異を検出するために脱塩基部位 X を設け、構築された疎水場空間にレセプター分子を導入した。なお、レセプター分子としては、標的塩基 S が C であるときに選択的に消光する A M N D を用いた。

【0040】

具体的には、被検体となる 1 M の一本鎖 DNA 溶液 (上記配列 C) と脱塩基部位を含む 1 M の一本鎖 DNA 溶液 (上記配列 D) とをそれぞれ 2 5  $\mu$  l、5 0 0 m M N a C l を 5 0  $\mu$  l、5 m M E D T A を含む 5 0 m M カコジル酸ナトリウム (p H 7. 0) を 5 0  $\mu$  l、1 2 5  $\mu$  M A M N D を 5 0  $\mu$  l 混合し、M i l l i Q 水を加えて全量を 2 5 0  $\mu$  l とした。得られた DNA 溶液について、サーマルサイクラーでアニーリング処理を行っ 20 たものを行わなかったものとを準備し、蛍光強度を測定した。蛍光測定は、光路長 1 m m の蛍光測定用セルを用い、反射蛍光測定により行った。

【0041】

脱塩基部位 X に対応する標的塩基 S が C, G である場合のそれぞれについて、DNA を加えなかった場合の蛍光強度 ( $F_0$ ) と、加えた場合の蛍光強度 ( $F$ ) との比 ( $F/F_0$ ) を図 9 に示す。ここで、図 9 における励起波長は 3 5 0 n m であり、蛍光波長は 4 0 0 n m である。また、サンプル 0 1 はアニーリング処理を行わなかった DNA 溶液であり、サンプル 0 2, 0 3 はアニーリング処理を行った DNA 溶液である。図 9 に示すように、標的塩基 S が C である場合に著しく消光しているため、消光の有無を検出することで、標的塩基 S が C (シトシン) であるか G (グアニン) であるかを知ることができる。 30

【0042】

アニーリング処理を行わなかった DNA 溶液をプラスチック製の透明チューブに入れ、励起波長 3 0 2 n m の UV ランプを用いて蛍光を目視検出した結果を図 1 0 に示す。図 1 0 に示すように、標的塩基 S が C である場合に著しく消光しており、目視でも確認可能である。

【0043】

実施例 6実際の配列での検討 2

実施例 6 では、実際の p 5 3 関連遺伝子の 1 7 5 番アミノ酸における一塩基置換を検出する効果を検証するために、以下のような配列を株式会社日本遺伝子研究所に受注して合成 40 した。ここで、下記配列中、X は脱塩基部位 (A P s i t e) であり、R は G (グアニン) 又は A (アデニン) を示す。

(配列 E) 5' - G A G G C R C T G C C - 3' (配列番号 9, 1 0)

(配列 F) 3' - C T C C G X G A C G G - 5' (配列番号 1 1)

上記配列 E において、脱塩基部位 X に対応する標的塩基 R は、正常型では G (配列番号 9) であり、変異型では A (配列番号 1 0) である。これにより、1 7 5 番アミノ酸はアルギニンからヒスチジンに変異する。本実施例では、この G から A への変異を検出するために脱塩基部位 X を設け、構築された疎水場空間にレセプター分子を導入した。なお、レセプター分子として標的塩基 R が G であるときに選択的に消光するプテリンを用いた以外は、実施例 5 と同様にして行った。



## 【 0 0 4 4 】

脱塩基部位 X に対応する標的塩基 R が G, A である場合のそれぞれについて、DNA を加えなかった場合の蛍光強度 ( $F_0$ ) と、加えた場合の蛍光強度 ( $F$ ) との比 ( $F/F_0$ ) を図 11 に示す。ここで、図 11 における励起波長は 360 nm であり、蛍光波長は 440 nm である。また、サンプル 01 はアニーリング処理を行わなかった DNA 溶液であり、サンプル 02 はアニーリング処理を行った DNA 溶液である。図 11 に示すように、標的塩基 R が G である場合に消光しているため、消光の有無を検出することで、標的塩基 R が G (グアニン) であるか A (アデニン) であるかを知ることができる。

## 【 0 0 4 5 】

アニーリング処理を行わなかった DNA 溶液について、励起波長 302 nm の UV ランプ 10 を用いることで、蛍光を目視検出した結果を図 12 に示す。図 12 に示すように、対応塩基 R が G である場合に消光しており、目視でも確認可能である。

## 【 0 0 4 6 】

このように、本実施の形態における一塩基置換検出方法によれば、一塩基置換部位を有する一本鎖の標的 DNA と、この標的 DNA と相補的であり、且つ一塩基置換部位に対応する対応塩基が除かれた一本鎖の検出用 DNA とで二本鎖核酸を形成させ、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプター分子を添加して一塩基置換部位と水素結合を形成させ、このレセプター分子の蛍光強度変化を測定することにより、一塩基置換を効果的に検出することができる。

## 【 0 0 4 7 】

特に、被検体となる標的 DNA のラベル化や熱制御等の煩雑な操作が原則的に不要であるため工程数が非常に少なく、また、原理上二本鎖 DNA 自体の熱的な安定性に依存しないため、検出までの時間が非常に短時間であり、再現性にも優れている。また、UV ランプを用いた目視による確認も可能であるため、特別な設備を持たない状況下においても検出が可能である。

## 【 0 0 4 8 】

さらに、脱塩基部位を含む検出用 DNA を基板に多数集積した DNA マイクロアレイを作製し、一塩基置換検出用キットとして用いることで、従来の欠点を克服したハイスループットな診断が可能となる。

## 【 0 0 4 9 】

## 【 発明の効果 】

以上詳細に説明したように、本発明に係る一塩基置換検出方法によれば、一塩基置換部位を有する一本鎖の標的核酸と、この標的核酸と相補的であり、且つ一塩基置換部位に対応する対応塩基が除かれた一本鎖の検出用核酸とで二本鎖核酸を形成させ、この二本鎖核酸に水素結合性及び発蛍光性を有するレセプターを添加して一塩基置換部位と水素結合を形成させ、このレセプターの蛍光強度変化を測定することにより、一塩基置換を簡便且つ迅速に検出することができる。

## 【 0 0 5 0 】

また、本発明に係る一塩基置換検出用キットによれば、従来の欠点を克服したハイスループットな診断が可能となる。

## 【 0 0 5 1 】

## 【 配列表 】

20

30

40

## SEQUENCE LISTING

<110> Teramae Norio

Tokyo instruments, Inc.

<120> 一塩基置換検出方法及び一塩基置換検出用キット

10

<130> 03P07T102

<160> 11

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized sequence composed of 11-mer oligodeoxynucleotides, in which sixth deoxynucleotide is an abasic site.

<400> 1

tccaggcaac

10

30

<210> 2

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

⟨223⟩ Artificially Synthesized Sequence

⟨400⟩ 2

gttgcgctgg a

11

⟨210⟩ 3

⟨211⟩ 11

10

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

⟨220⟩

⟨223⟩ Artificially Synthesized Sequence

⟨400⟩ 3

gttgccctgg a

11

20

⟨210⟩ 4

⟨211⟩ 11

⟨212⟩ DNA

⟨213⟩ Artificial Sequence

30

⟨220⟩

⟨223⟩ Artificially Synthesized Sequence

⟨400⟩ 4

gttgcactgg a

11

⟨210⟩ 5

⟨211⟩ 11

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 5

10

gttgctctgg a

11

<210> 6

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 6

ctgccccac c

11

<210> 7

30

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

40

<400> 7

ctgccgccac c

11

<210> 8

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Artificially synthesized sequence composed of 11-mer oligodeoxynucleotides, in which sixth deoxynucleotide is an abasic site.

<400> 8

ggggggcag

10

20

<210> 9

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

30

<400> 9

gagggcctgc c

11

<210> 10

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Artificially Synthesized Sequence

<400> 10

gaggcacatgc c

11

10

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificially synthesized sequence composed of 11-mer oligodeoxynucleotides, in which sixth deoxynucleotide is an abasic site.

20

<400> 11

ggcaggcctc

10

#### 【配列表フリーテキスト】

配列番号 1 : 人工的に合成された 11-mer のオリゴデオキシヌクレオチドからなる配列。6 番目のデオキシヌクレオチドが脱塩基部位とされる。

30

配列番号 2 : 人工的に合成された配列

配列番号 3 : 人工的に合成された配列

配列番号 4 : 人工的に合成された配列

配列番号 5 : 人工的に合成された配列

配列番号 6 : 人工的に合成された配列

配列番号 7 : 人工的に合成された配列

配列番号 8 : 人工的に合成された 11-mer のオリゴデオキシヌクレオチドからなる配列。6 番目のデオキシヌクレオチドが脱塩基部位とされる。

配列番号 9 : 人工的に合成された配列

配列番号 10 : 人工的に合成された配列

40

配列番号 11 : 人工的に合成された 11-mer のオリゴデオキシヌクレオチドからなる配列。6 番目のデオキシヌクレオチドが脱塩基部位とされる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】本実施の形態における一塩基検出の原理を説明する図である。

【図 2】標的塩基がシトシンである場合の T<sub>m</sub> 値の AMND 濃度依存性を示す図である。

【図 3】標的塩基がアデニン、シトシン、グアニン、チミンである場合の AMND の添加前後の CD スペクトルを示す図である。

【図 4】標的塩基がシトシンである場合の CD スペクトルの AMND 濃度依存性を示す図である。

【図 5】標的塩基がシトシンである場合の AMND 濃度とモル精円率との関係を示す図で 50

ある。

【図 6】AMND 添加後の Amber 力場 (Macro Model) による最安定化構造を示す図であり、

【図 7】AMND 添加後の蛍光強度の減少値を示す図である。

【図 8】プテリン添加後の蛍光強度の減少値を示す図である。

【図 9】標的塩基がシトシン、グアニンである場合の AMND 添加後の蛍光スペクトルを示す図である。

【図 10】標的塩基がシトシン、グアニンである場合の AMND 添加後の蛍光を示す図である。

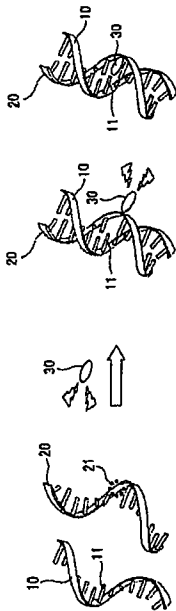
【図 11】標的塩基がシトシン、グアニンである場合のプテリン添加後の蛍光スペクトル 10  
を示す図である。

【図 12】標的塩基がシトシン、グアニンである場合のプテリン添加後の蛍光を示す図である。

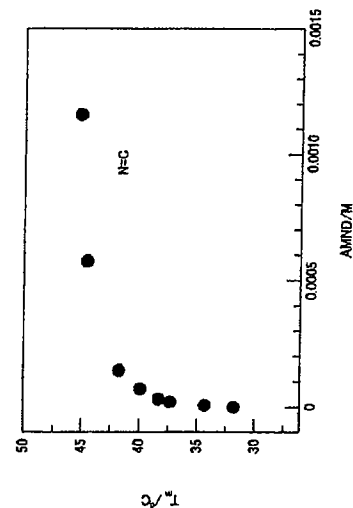
【符号の説明】

10 標的核酸、11 標的塩基、20 検出用核酸、21 脱塩基部位、30 レセプター分子

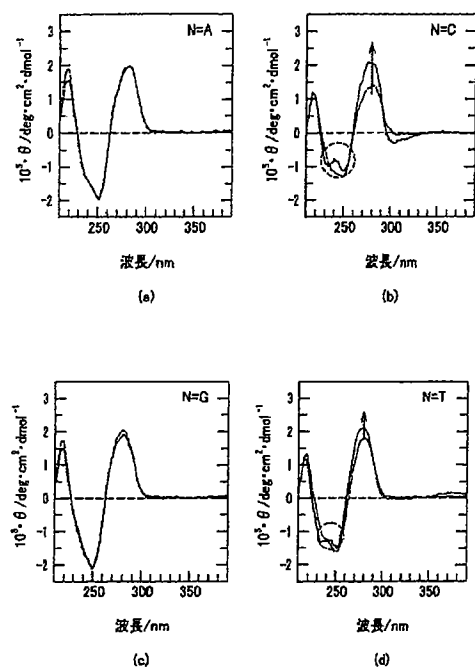
【図 1】



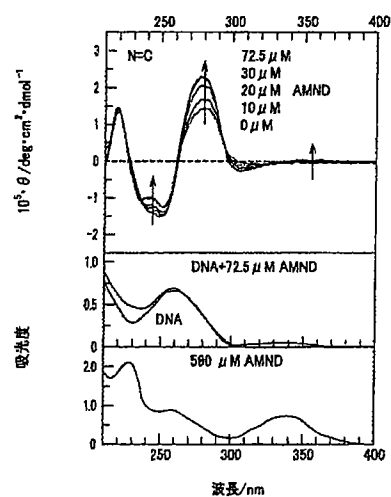
【図 2】



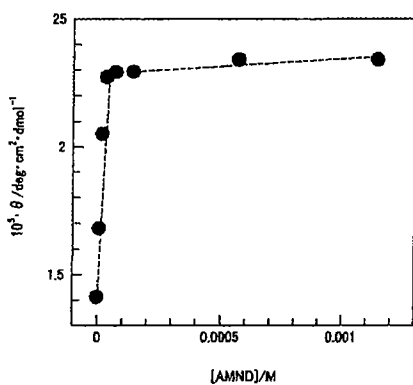
【 図 3 】



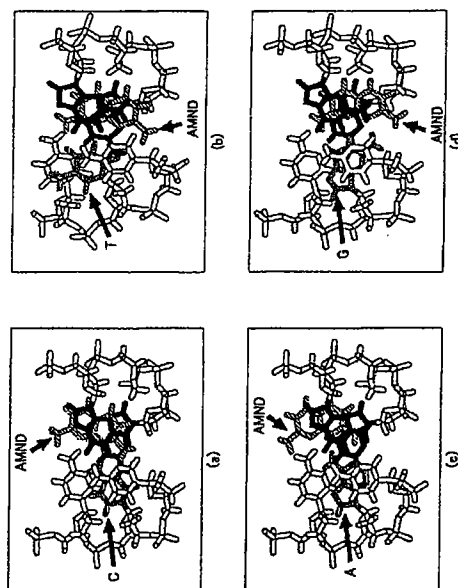
【 図 4 】



【 図 5 】

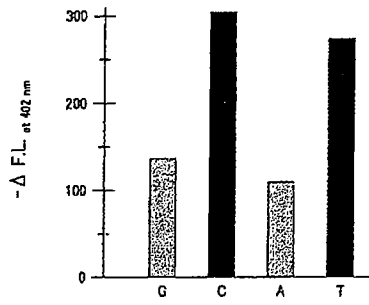


【 図 6 】

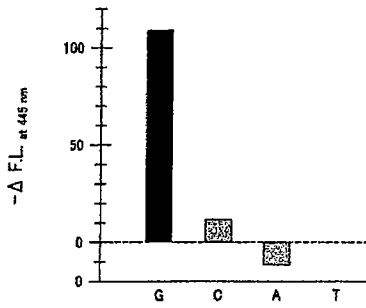




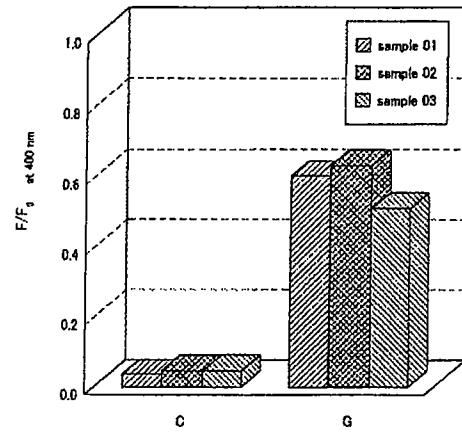
【 図 7 】



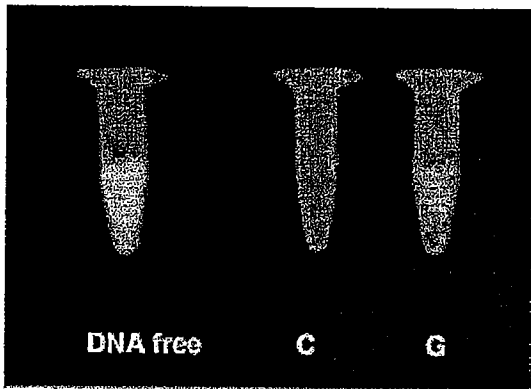
【 図 8 】



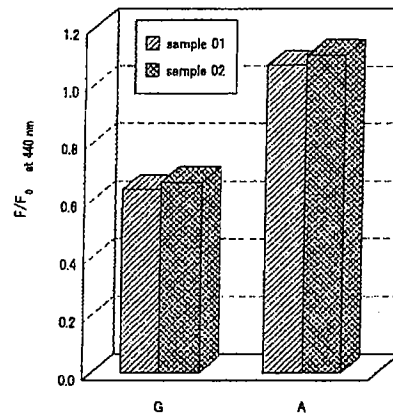
【 図 9 】



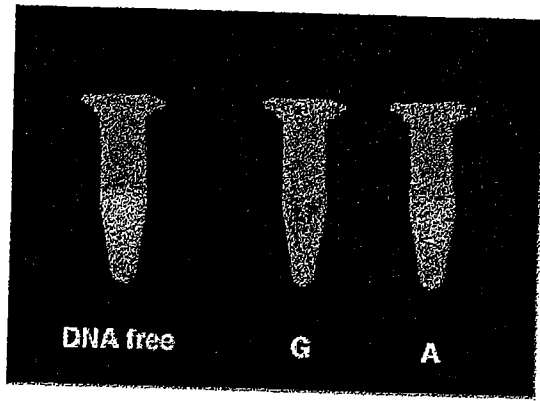
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/58	A
// G 0 1 N 33/542	G 0 1 N 33/542	A

(72) 発明者 西沢 精一

宮城県仙台市青葉区中山 5 丁目 1 8 番 5 - 5 0 4

(72) 発明者 寺前 紀夫

宮城県仙台市青葉区川内元支倉 3 5 川内住宅 1 - 5 0 1

(72) 発明者 吉本 敬太郎

宮城県仙台市泉区南光台 1 - 4 5 - 4 ハイツシャトー B 1 0 1

F ターム (参考) 2G045 AA25 BA11 DA12 DA13 DA14 DA77 FA18 FA27 FA29 FB02  
 FB07 FB12 GC11 GC15  
 2G054 AB02 BA04 CA22 CE02 EA03 EA05 EA07 EB01 EB02 GA02  
 GA04 GB02 GB04 GE06 GE09 JA02  
 4B024 AA11 CA01 CA11 HA12  
 4B063 QA01 QA17 QA18 QQ42 QQ52 QR55 QR66 QS11 QS34 QS36  
 QX02